



A fagyasztás előtti ekvilibrációs idő meghosszabbításának hatása a kanspermiumok membránintegritására

¹Makkosné Petcz B., ²Pécsi T., ¹Salamon I., ¹Koltai J., ¹Kiss R.,
¹Bali Papp Á.

¹Nyugat-Magyarországi Egyetem Mezőgazdaság- és Élelmiszertudományi Kar, 9200 Mosonmagyaróvár, Vár 4.
²Mesterséges Termékenyítő Állomás, 4014 Debrecen-Pallag, Mezőgazdász út 2.

ÖSSZEFOGLALÁS

A világ számos laboratóriumában kísérleteznek a különféle haszonállatok termékenyítő anyagának fagyasztva történő tárolásával. Kísérleteink célja, hogy megvizsgáljuk a fagyasztás előtti ekvilibrációs idő meghosszabbításának hatását a kanspermiumok membránintegritására. Munkánk során hét kantól vettünk ejakulátumot és kétféle módon kezelve fagyasztottuk le a mintákat. Az egyik kezelés egy órával hosszabb ekvilibrációs időt tartalmazott. A fagyasztás előtti kezelések egyes lépései és a fagyasztást követő felolvasztás után a termékenyítő anyagokból mintát vettünk és a Kovács-Foote féle festést alkalmazva megvizsgáltuk a spermiumok életképességét és akroszómájának épségét, összehasonlítva a két hűtési eljárást. A kísérletet nyáron és ősszel is elvégeztük, hogy az esetleges szezonális különbségekre is fényt derítsünk. A hosszabb ideig tartó ekvilibrálás kedvező hatással volt a spermiumok életképességére, az élő, ép akroszómájú spermiumok aránya szignifikánsan magasabb volt a hosszabb pihentetést követően, mint a kontroll esetében. A nyári és az őszi kísérleteink eredményeit átlagolva a hosszabb pihentetés a spermiumok motilitási eredményeiben is szignifikáns különbséget hozott. A kétféle fagyasztási eljárás eredményeként létrejött termékenyítési anyagokat folyékony nitrogénben tároljuk, és a jövőben termékenyítéseket tervezünk végezni, hogy ellenőrizzük a két hűtési eljárás alkalmasságát.

(Kulcsszavak: termékenyítő anyag, spermamélyhűtés, hosszabb pihentetés, életképesség, motilitás, farokfestés)

ABSTRACT

Effect of the longer equilibrations time for the membrane integrity of boar spermatozoa

B. Makkos-Petcz¹, T. Pécsi², I. Salamon¹, J. Koltai¹, R. Kiss¹, Á. Bali Papp¹

¹University of West Hungary Department of Agricultural and Food Sciences, H-9200 Mosonmagyaróvár, Vár 4.

²Hungarian Artificial Insemination Station, H-4014 Debrecen-Pallag, Mezőgazdász út 2.

Several laboratories make experiments with freezing of sperm of various livestock. The aim of our present work was to examine the effect of the extension of equilibration time before freezing on the membrane integrity of boar spermatozoa. In pursuance of our work, ejaculates of 7 boars were taken and the samples were cryopreserved by two freezing methods. One of the methods has one our longer equilibration time than the other one. After treatments before freezing and after warming the sperm, samples were taken and thereafter were stained by the method of Kovács-Foote. Afterwards the motility and the integrity of the acrosome were examined, and the two treatments were compared. To examine possible

seasonal differences the experiments were done in summer and in autumn, too. The longer time of equilibration has positive effect on the viability of spermatozoa and the rate of live spermatozoa with intact acrosome was significantly higher in the longer equilibration group than for the control ($P < 0.05$), and the average motility results of the two seasons show significant difference. The difference between some individuals was not significant. We also didn't find significant difference between the results of the summer and autumn experiments. Now, the treated sperms are stored in liquid nitrogen. We plan to make inseminations with these sperms in the future to control the suitability of both freezing methods.

(Keywords: semen for fertilization, semen deep freezing, longer equilibration, live and motility, tail staining)

BEVEZETÉS

A világ számos laboratóriumában végeztek és végeznek kutatómunkát a különféle haszonállatok termékenyítő anyaga hosszútávú tárolásának megoldására. Legeredményesebbnek a fagyasztva történő tárolás bizonyult, annak ellenére, hogy a fagyasztás és a felolvasztás felére csökkenti a spermiumok motilitását (Tuli és mtsai., 1992). A túlélő mozgékony spermiumok mozgása más, kevésbé aktív, mint a friss ejakulátum spermiumaié (Verheyen és mtsai., 1993). A legtöbb mesterséges termékenyítést folyékony állapotú hígított spermával végzik ugyanazon a napon, melyen levették a termékenyítő anyagot, vagy 1-5 napos 15-20°C-on történő tárolást követően (Johnson és mtsai., 2000). Fagyasztott sertés sperma 1975 óta szerezhető be mind pellet, mind szalmában tárolt formában (Johnson és mtsai., 2000).

A mai napig használt különféle fagyasztási alaptéchnikák döntő lépései lényegében megegyeznek. Eltérések elsősorban az ekvilibrációs idő hosszában, az egyes fázisok sorrendjében, a spermium-koncentráció beállításában illetve a hígításban és a fagyasztás ütemében és a csomagolás szisztémájában adódnak. Mindegyik technika alkalmazza a centrifugálás előtti szemínális plazmában való ekvilibrációt, a centrifugálást, a koncentrált formában történő sperma fagyasztását és az alacsony koncentrációjú glicerinnel való hozzáadását. Számos kutatócsoport saját hígítót fejlesztett ki a fagyasztáshoz: Polge és mtsai. (1970); Graham és mtsai. (1971); Crabo és Einarsson (1971); Visser és Salamon (1974); Pursel és Johnson (1971, 1975); Westendorf és mtsai. (1975); Larsson és Einarsson (1976a); Paquignon és Courot (1976). Gadea és mtsai. (2004) a felovasztó hígítóba glutatont – L- γ -glutamil-L-cisztein-glicin – (GSH) keverését javasolják, mert méréseik szerint 32% csökkenés tapasztalható a fagyasztás után a friss termékenyítő anyaggal összehasonlítva ($P < 0,001$). Azt tapasztalták, hogy a GSH felovasztó hígítóba adagolása növelte a kanspermiumok termékenyítő képességét in vitro körülmények között.

Sokan foglalkoztak a tárolni kívánt termékenyítő anyag különféle csomagolási módjaival. 2 ml-es lapos szalmát Weitze és mtsai. (1988) valamint Ewert (1988), 5 ml-es műanyag tasakot pedig Rodriguez-Martinez és mtsai. (1996) alkalmaztak először, jelenleg egyik sincs már használatban (Johnson és mtsai., 2000). Bármely eljárás, melyben a spermiumok testhőmérsékletéről gyors ütemben közel fagypontra hűlnek irreverzibilisen befolyásolja a spermiumok életképességét. A fagyasztás-felolvasztás túlélése szempontjából a spermiumok számára a sejtmembrán állapotának változása döntő jelentőségű. Optimális védelmet kellene biztosítani a plazmamembrán részére a procedura alatt. A membrán azonban nem egy homogén sejtalkotó, így hasonló kezelésekre a spermiumok különböző részei másképp reagálnak. A kansperma különös érzékenységet mutat a fagyasztási kezelésekkal szemben. A sertés spermiumok néhány órás inkubációval rezisztenciát szerezhetnek a hűtési károsodásokkal szemben (Pursel és mtsai., 1973). Különböző adalékanyagok a sérülésekkel szemben további

rezisztencia kialakulását eredményezhetik. A tojássárgája, mely a gazdasági állatok esetében védelmet nyújt a hidegsokkal szemben önmagában nem okoz hasonló fokú védettséget a sertés spermiumoknál (Benson és mtsai., 1967), de Orvus ES Paste-vel kombinálva igen. (Pursel és mtsai., 1978a; Strzerek és mtsai., 1984). A hűtés okozta sérülések bizonyos antioxidánsok, mint a ditret-butyl-kresol (DTBK), az echinochrom (Golyshev, 1985) és a butilált hidroxitoluin (BHT) (Graham és Hammerstedt, 1992) hatására csökkennek. Alacsony koncentrációjú BHT jelenléte alacsony fokú, percenkénti 5°C hűtési sebesség mellett növeli a spermiumok élethosszát (Bamba és Cran, 1992). A mai napig nincs olyan tökéletes fagyasztási eljárás, amely magas színvonalon megőrizné a kansperma termékenyítő képességét. A motilitással együtt az akroszóma vizsgálata is széles körben használt a fagyasztott felolvasztott kanspermiumok életképességének vizsgálatakor, mivel az akroszóma funkcionális épsége elengedhetetlen a fertilizáció mechanizmusában (Larsson, 1985).

Pavelko és Crabo (1976) legkevesebb négy és fél óras ekvibrációs időt ajánlanak ahhoz, hogy kielégítő eredmény szülessen. A hazai és a nemzetközi gyakorlatban kétszer két óras ekvibrációs idővel történik a kansperma előkezelése a fagyasztást megelőzően. Jelen kísérletünk célja, hogy összehasonlítsuk a hagyományos és egy órával meghosszabbított pihentetési idő hatását a kanspermiumok életképességére és membránintegritására, valamint az esetleges szezonális különbségekre is fényt derítsünk, ezért a kísérletet nyáron és ősszel is elvégeztük.

ANYAG ÉS MÓDSZER

A kísérleteket a debreceni Mesterséges Termékenyítő Állomáson végeztük el. Az esetleges szezonális különbségek feltárására az egész vizsgálat sorozatot kétszer hajtottuk végre, egyszer a nyár és egyszer az őszy folyamán. A fagyasztás előtti spermakezelések során három különféle hígító kerül a levett termékenyítő anyaghoz.

- Az I-es számú hígító összetétele: 37 g glükóz, 6 g nátrium citrát, 1,3 g nátrium-bikarbonát, 1,3 g EDTA, 0,8 g KCl, 0,6 g penicillin, 1 g dihidro-streptomycin 1000 ml-re kiegészítés.
- A II-es számú hígító összetétele: 80 ml 11%-os laktóz oldat, 20 ml tojássárgája
- A III-as számú hígító összetétele: 89,5 ml II-es hígító, 1,5 ml Orvus ES Paste, 9 ml glicerin.

Elsőként a frissen levett ejakulátum mennyiségét, a spermiumkoncentrációt, és a spermiumok motilitását értékeltük. Az Uppsalában kidolgozott módszer (Larsson, 1985) szerint 50 ml 30 °C-os spermához 150 ml 30 °C-os I-es számú hígítót öntöttünk, majd a mintát 15 °C-on három órán át pihentettük. Az ekvibráltatás után centrifugálás következik 800 g-n 10 percen keresztül. A felülúszó leöntésre kerül úgy, hogy kb. 25 ml koncentrált sperma maradjon. A mintát ismét hígítottuk II-es számú hígítóval 1:1 arányban. Ezt ismételt pihentetés követi, melyet 5 °C-on két órán át végeztünk. A III-as számú hígítót ezután adtuk a mintához 5 °C-on, hogy elérjük az 100×10^6 /ml-es sejtkoncentrációt. Ezt követően a termékenyítő anyagot 0,5 ml-es műszalmába töltöttük és kezdetét vette a fagyasztás. A mintát 5 °C-ról 3 °C/perces sebességgel -6 °C-ra hűtöttük és egy percet állni hagytuk. Ezután -100 °C-ra csökkentettük a minta hőmérsékletét 20 °C/perces hűtési sebességgel. A végleges tárolás folyékony nitrogénben történik. A felolvasztás során a szalmákat 40 másodpercre 50 °C-os vízfürdőbe helyeztük, majd tartalmukat átöntöttük egy alkalmas tárolóedénybe és szobahőmérsékletű I-es számú hígítóval 5 ml-re egészítettük ki.

A kísérletbe bevont hét kantól alkalmanként (nyár illetve ősz) ejakulátumot gyűjtöttünk és kétféle előkészítést követően fagyasztottuk le. A minták egyik felét az

uppsalai előírást nem változtatva (kontroll), másik felét az I-es számú hígító hozzáadása utáni ekvilibrációs idő egy órával való megnövelésével (kezelés). A spermakezelés egyes lépései után minden esetben mintát vettünk, kenetet készítettünk és a Kovács-Foote féle festési eljárást (Kovács és Foote, 1992) alkalmazva fénymikroszkóp alatt 1000-szeres nagyítás mellett vizsgáltuk meg a plazmamembrán és az akroszóma épségét (élő, ép akroszómájú ondósejtek százalékos aránya, LI%), 200–200 sejtet értékelve kenetenként.

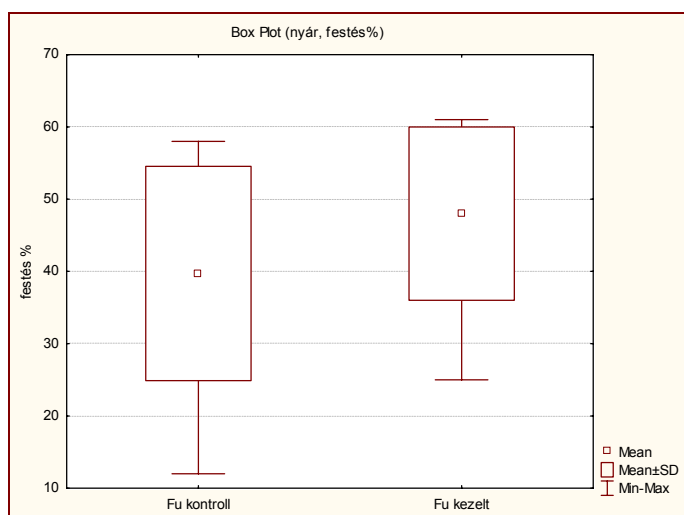
A kísérleti adatokat Microsoft Excel segítségével rendeztük és a Statistica for Windows 6.0 statisztikai szoftverrel értékeltük. Végül t-próbával igazoltuk kísérleti eredményekben meglévő szignifikáns különbségeket. A rövidebb és hosszabb ekvilibrációs idővel történt fagyasztási kísérletek adatai átlagának és szórásának meghatározását követően az adatok egytényezős statisztikai analizisét végeztük el. Külön hasonlítottuk össze a festési adatokat (élő, ép és motilis spermatozoák aránya), és külön a szabad szemmel végzett motilitás vizsgálat adatait.

EREDMÉNY ÉS ÉRTÉKELÉS

Elsőként a nyáron elvégzett kísérletek eredményei kerülnek bemutatásra. A Kovács-Foote féle festést alkalmazva a festődött spermium farkat tartalmazó csoportokat vizsgálva szignifikáns különbség van a hagyományosan hűtött és a kezelt csoport között. (1. ábra)

1. ábra

Box-whisker diagram. A kontroll és a kezelt csoportok festési adatainak (élő, ép és motilis spermiumok) átlag, átlag±szórás, és minimum-maximum értékei (nyár)



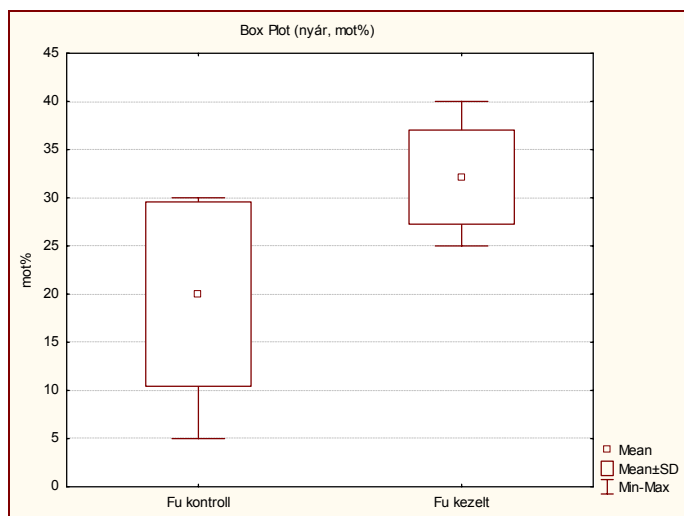
$P < 5\%$, Fu=fagyasztás és újraolvasztás után (Fu=after freezing and thawing)

Figure 1: Box-whisher diagram. The mean, mean±SD, and minimum-maximum Live Intact and motile % value of control and treated groups (summer)

Szintén szignifikáns különbség adódott a kontroll és a kezelt csoportok motilitás vizsgálatánál. A különbséget a 2. ábra mutatja be.

2. ábra

Box-whisker diagram. A kontroll és a kezelt csoportok motilitásvizsgálatának átlag, átlag±szórás, és minimum-maximum értékei (nyár)



$P < 5\%$, Fu=fagyasztás és újraolvasztás után (Fu=after freezing and thawing)

Figure 2: Box-whisker diagram. The mean, mean±SD, and minimum-maximum motile % value of control and treated groups (summer)

Mind a kezelt, mind a kontroll csoporton belüli vitalitást és motilitást együttesen feltáró festési eredményeket összehasonlítva a szabad szemmel végzett motilitási eredményekkel azt tapasztaltuk, hogy a közöttük adódó különbségek szignifikánsak.

Az ősszel elvégzett kísérletek kontroll és kezelt csoportjai között annak ellenére, hogy közöttük lényeges eltérések láthatók, nincs szignifikáns különbség. A 3. és a 4. ábra ezeket az eredményeket mutatja be.

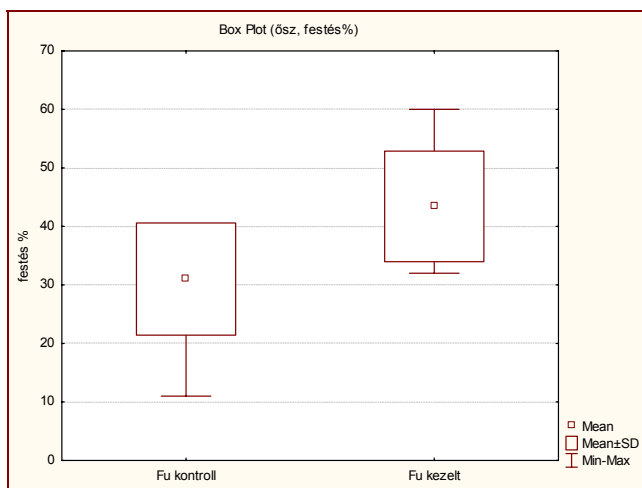
A nyáron és ősszel elvégzett kísérletek eredményeit átlagoltuk és elvégeztük a t-próbát. Összehasonlítottuk a kezelt és a kontroll csoportok átlageredményeit külön az életképességet és motilitást feltáró festés esetében, és külön a mozgásvizsgálat tekintetében. Mind a festési eredmények, mind a szabad szemmel végzett motilitás eredmények statisztikai vizsgálatok szignifikáns eltérés volt kimutatható a kezelt csoport javára. Az egyes egyedek eredményeit is összehasonlítva azt tapasztaltuk, hogy közöttük nincs szignifikáns különbség. A nyáron és az ősszel elvégzett kísérletek eredményei között sem adódott szignifikáns eltérés.

KÖVETKEZTETÉSEK

Hosszú idejű tárolás során a spermiumokat fagyasztják, ebben az állapotban tárolják és felolvasztják majd termékenyítenek velük. A sertés spermiumok bármiféle tartósítása, de különösen a fagyasztás és az azt követő felolvasztás csökkent életképességet eredményeznek (Paulenz és mtsai, 1995). A sikeres termékenyítést nehéz előre megjósolni a fagyasztott felolvasztott sperma in vitro minőségéből (Woelders, 1990).

3. ábra

Box-whisker diagram. A kontroll és a kezelt csoportok festési adatainak (élő, ép és motilis spermiumok) átlag, átlag±szórás, és minimum-maximum értékei (ősz)

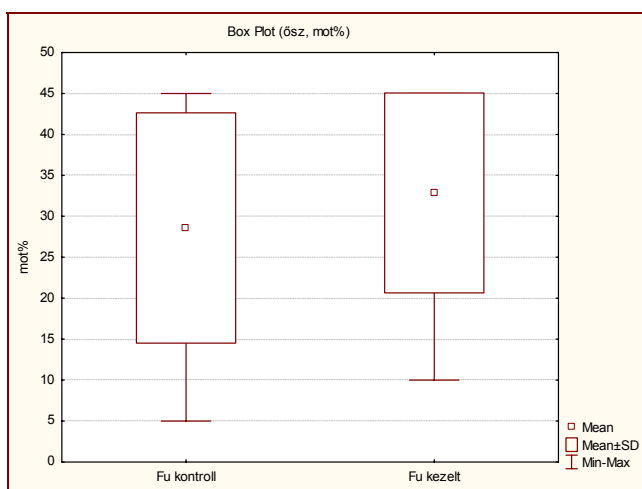


Fu=fagyasztás és újraolvasztás után (Fu=after freezing and thawing)

Figure 3: Box-whisher diagram. The mean, mean±SD, and minimum-maximum Live Intact and motile % value of control and treated groups (autumn)

4. ábra

Box-whisker diagram. A kontroll és a kezelt csoportok motilitásvizsgálatának átlag, átlag±szórás, és minimum-maximum értékei (ősz)



Fu=fagyasztás és újraolvasztás után (Fu=after freezing and thawing)

Figure 4: Box-whisher diagram. The mean, mean±SD, and minimum-maximum motile % value of control and treated groups (autumn)

Egyes tulajdonságok, mint a normál akroszóma (Xu és mtsai, 1998), normál fej és fark morfológia (Gadea és Matas, 2000), és a progresszív előrehaladó mozgás (Ivanova és Mollova, 1993; Flowers, 1997) pozitív összefüggést mutatnak a termékenyítő képességgel.

Az akroszóma épségének és a plazma membrán integritásának vizsgálati eredménye jól jelzi a sperma minőségét, és gyakran használják a fagyasztott és felolvasztott sertés sperma életképességének becslésére (Vazquez és mtsai, 1999). Vizsgálatunkban a friss ejakulátum motilitási eredményeiből nem lehet következtetni az ugyanazon kantól származó fagyasztott felolvasztott sperma várható motilitási eredményeire jelezve, hogy az egyes kanok termékenyítő anyagának fagyaszthatósága között jelentős különbség van. A tárolt sertés spermiumok rövid ideig élnek a női nemi szervekben (Pursel és mtsai, 1978b), ezért a 37,8 °C-on történő 4 órás inkubálás utáni spermaminőség vizsgálat pontosabb információt ad a sertés spermium termékenyítő képességéről, mint a felolvasztást követő azonnali motilitási vizsgálat (Larsson és Einarsson, 1976b).

Gyakori az eltérés a motilitási és a vitális festési eredmények között (Koehler, 1985). A sikeres termékenyítéshez nem elegendő a spermiumfej membránjának strukturális épsége. Szükséges, hogy a spermium motilis is legyen, mivel a feji részükön nem festődött, élőnek tekintett, de farkukon festődött spermiumok, a farkmembránsérülések következtében nem mozognak, így termékenyítésre nem képesek (Nagy és mtsai., 1999). A hőmérséklet változása jelentősen befolyásolja a kanspermium fej plazma membránjának permeabilitását (Canvin és Buhr 1989). A membrán épségének megőrzése kulcsfontosságú e tekintetben. Az ekvilibrációra azért van szükség, mert elősegíti a spermiumok fagyasztás és felolvasztás alatti károsodásokkal szembeni ellenállását. A rezisztencia kialakulása valószínűleg a spermium membránjának a szeminális proteinekkel való interakciójának köszönhető (Pavelko és Crabo 1976). Kísérleteinkben az ekvilibrációs idő meghosszabbítása kedvező hatással volt a spermiumok életképességére, az élő, ép akroszómájú és motilis spermiumok aránya szignifikánsan magasabb volt a hosszabb pihentetést követően, mint a kontroll esetében. A motilis spermiumok aránya az ekvilibrációs idő előrehaladtával fokozatosan nő (Pavelko és Crabo 1976). A nyári és az őszi kísérletek átlageredményeit értékelve azt tapasztaltuk, hogy a hosszabb pihentetés a spermiumok motilitási képességében is szignifikáns változást okozott. A fagyasztás előtti kezelés alatti pihentetés hatására mind a nyári, mind az őszi mintákban az élő, ép akroszómájú sejtek arányának - bár nem szignifikáns, de kisebb mértékű - emelkedése meglepő. Nagy és mtsai. (2004) fagyasztott felolvasztott bikasperma négy órás inkubálásának első fél órájának a végén azt tapasztalták, hogy az élő, ép akroszómájú sejtek aránya kis mértékben emelkedett, ezzel párhuzamosan a holt/ép akroszómájú sejtek aránya csökkent.

A kísérleteink során előállított, kétféle kezelést követően fagyasztott termékenyítő anyagokkal, melyeket folyékony nitrogénben tárolunk, a jövőben termékenyítést fogunk végezni, hogy megállapítsuk a sperma előkezelésünk hatásosságát.

IRODALOM

- Bamba, K., Cran, D.G. (1992). Effects of treatment with butylated hydroxytoluene on the susceptibility of boar spermatozoa to cold stress and dilution. J. Reprod. Fert., 95. 69-77.
- Benson, R.W., Pickett, B.W., Komarek, R.J., Lucas, J.J. (1967). Effect of incubation and cold shock on motility of boar spermatozoa and their relationship to lipid content. J. Anim. Sci., 26. 1078-1081.
- Canvin, A.T., Buhr, M.M. (1989). Effect of temperature on the fluidity of boar spermatozoa membranes. J. Reprod. Fert., 85. 533-540.

- Crabo, B.G., Einarsson, S. (1971). Fertility of deep frozen boar semen. *Acta. Vet. Scand.*, 12. 125-127.
- Ewert, L. (1988). Experiments on preparation of boar spermatozoa for cryoconservation in straws and biological-physical aspects of thawing by microwaves. Thesis, School of Vet. Med., Hannover, 91.
- Flowers, W.L. (1997). Management of boars for efficient semen production. *J. Reprod. Fert.* 52. 67-78.
- Gadea, J., Matas, C. (2000). Sperm factors related to in vitro penetration of porcine oocytes. *Theriogenology.* 54. 1343-1357.
- Gadea, J., Sellés, E., Marco, M.A., Coy, P., Matás, C., Romar, R., Ruiz, S. (2004). Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation. Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Theriogenology.* 62. 690-701.
- Golyshev, N.A. (1985). Improvement of freezing technology of boar semen, *Zhivotnovodstvo.* 7. 49-51.
- Graham, J.K., Hammerstedt, R.H. (1992). Differential effects of butylated hydroxytoluene analogs on bull sperm subjected to cool-induced membrane stress. *Cryobiology,* 29. 106-107.
- Graham, E.F., Rajamannan, A.H.J., Schmehl, M.K.L., Maki-Laurila, M., Bower, R.E. (1971). Fertility studies with frozen boar spermatozoa. *A.I. Digest.* 19. 16-18.
- Ivanova, M., Mollova, M. (1993). Zona-penetration in vitro test for evaluating boar sperm fertility. *Theriogenology.* 40. 391-410.
- Johnson, L.A., Weitze, K.F., Fiser, P., Maxwell, W.M.C. (2000). Storage of boar semen. *Anim. Repr. Sci.*, 62. 143-172.
- Koehler, J.K. (1985). Mammalian sperm membranes: Their mosaic form and differential sensitivities. In: *Deep freezing of boar semen.* (Eds: Johnson, L.A., Larsson, K.) Uppsala, Sweden, 37-60.
- Kovács, A., Foote, R.H. (1992). Viability and acrosome staining of bull, boar and rabbit spermatozoa. *Biotechnic and Histochemistry.* 67. 119-124.
- Larsson, K. (1985). Boar sperm viability after freezing and thawing. *Proc 1st Int. Conf. Deep Freezing of Boar Semen,* Uppsala. 177-187.
- Larsson, K., Einarsson, S. (1976a). Fertility of deep frozen boar spermatozoa. Influence of thaw diluents and of boars. *Acta Vet. Scand.*, 17. 43-62.
- Larsson, K., Einarsson, S. (1976b). Influence of boars on the relationship between fertility and post-thawing sperm quality of deep frozen boar spermatozoa. *Acta Vet Scand.*, 17. 74-82.
- Nagy, Sz., Házás, G., Bali Papp, Á., Iváncsics, J., Szász, F., Szász, F. Jr., Kovács, A., Foote, R.H. (1999). Evaluation of sperm tail membrane integrity by light microscopy. *Theriogenology.* 52. 1153-1159.
- Nagy, Sz., Hallap, T., Johannisson, A., Rodriguez-Martinez, H. (2004). Changes in plasma membrane and acrosome integrity of frozen-thawed bovine spermatozoa during a 4 h incubation as measured by multicolor flow cytometry. *Anim. Reprod. Sci.*, 80. 225-235.
- Paquignon, M., Courot, M. (1976). Fertilizing capacity of frozen boar spermatozoa. *Proc. VIIIth Int. Congr. Anim. Reprod. & A.I,* Cracow, 4. 1041-1044.
- Paulenz, H., Drevle, I.S., Andersen, Berg K., Thomassen, R. (1995). The use of a dichromatic stain method (Spermac) for determining changes in the acrosomal integrity of boar semen during cryopreservation. *Reprod. Dom. Anim.*, 30. 113-116.

- Pavelko, M.K., Crabo, B.G. (1976). Possible importance of some sperm coating proteins and their behaviour during preservation of boar spermatozoa. Proc. VIIIth Int. Congr. Anim. Reprod. & A.I., Cracow, 4. 1045-1048.
- Polge, C., Salamon, S., Wilmut, I. (1970). Fertilizing capacity of frozen boar semen following surgical insemination. Vet. Rec., 87. 424-428.
- Pursel, V.G., Johnson, L.A. (1971). Fertilizing capacity of frozen boar spermatozoa. J. Anim. Sci., 33. 1162.
- Pursel, V.G., Johnson, S.A., Shulman, L.L. (1973). Effect of dilution, seminal plasma and incubation period on cold shock susceptibility of boar spermatozoa. J. Anim. Sci., 37. 532-535.
- Pursel, V.G., Schulman, L.L., Johnson, L.A. (1978a). Effect of Orvus ES Paste on acrosome morphology, motility and fertilizing capacity of frozen-thawed boar sperm. J. Anim. Sci., 7. 198-202.
- Pursel, V.G., Schulman, L.L., Johnson, L.A. (1978b). Distribution and morphology of fresh and frozen-thawed sperm in the reproductive tract of gilts after artificial insemination. Biol. Reprod., 19. 69-76.
- Pursel, V.G., Johnson, L.A. (1975). Freezing of boar spermatozoa. Fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. J. Anim. Sci., 40. 99-102.
- Rodriguez-Martinez, H., Eriksson, B., Lundeheim, I. (1996). Freezing boar semen in flat plastic bags. Membrane integrity and fertility. Proc. 3rd Int. Conf. Deep Freezing Boar Semen. Reprod. Dom. Anim. 31 Blackwell, Berlin, 161-168.
- Strzezek, J., Glogowski, J., Magierka, E., Lubera, Z., Jabbonosvska, C. (1984). Some aspects of cryobiochemistry of boar semen. Proc. 10th Int. Congr. Anim. Reprod. A.I., Urbana, IL 2. 224.
- Tuli, R.K., Schmidt-Baulain, R., Holtz, W. (1992). Computer-assisted motility assessment of spermatozoa from fresh and frozen-thawed semen of the bull, boar and goat. Theriogenology. 38. 487-490.
- Vazquez, J.M., Martinez, E., Roca, J., Lucas, X., Parrilla, I., Gil, M.A. (1999). Metodos y estrategias en la evaluacion de espermatozoides criopreservados de verraco. Proc. of II Congreso Iberico de Reproduccion Animal. 1. 377-81.
- Verheyen, G., Pletincx, I., VanSteirteghem, A. (1993). Effect of freezing method, thawing temperature and post-thaw dilution/washing on motility (CASA) and morphology characteristics of high-quality human sperm. Hum. Reprod., 8. 1678-1684.
- Visser, D., Salamon, S. (1974). Effect of composition of Tris-based diluent on survival of boar spermatozoa following deep freezing. Aust. J. Biol. Sci., 27. 485-497.
- Weitze, K.F., Rath, D., Leps, H. (1988). Influence of volume/surface ratio of plastic packages upon freeze-thaw rate and fertility of boar semen. Proc. 11th Int. Cong. Anim. Reprod. Artif. Insem., Dublin, 3. 312.
- Woelders, H. (1990). Overview of in vitro methods for evaluation of semen quality. Reprod. Dom. Anim., 1. 146-165.
- Westendorf, P., Richter, L., Treu, H. (1975). Zur Tiefgefrierung von Ebersperma Labor- und Besamungsergebnisse mit dem Hulsenberger Pailletten-Verfahren. Dtsch. Tierärztl. Wschr., 82. 261-300.
- Xu, X., Pommier, S., Arbov, T., Hutchings, B., Sootto, W., Foxcroft, G.R. (1998). In vitro maturation and fertilization techniques for assessment of semen quality and boar fertility. J. Anim. Sci., 76. 3079-3089.

Levelezési cím (*Corresponding author*):

Makkosné Petz Brigitta

H-9211, Feketeerdő, Dózsa György u. 1.

e-mail: insulin_hu@yahoo.de